品番：MYC001

人と科学のステキな未来へ
コスモ・バイオ株式会社

2013年3月作成(第1版)

［食品検査用試薬］

MycoCatchトータルアフラトキシン≪取扱説明書≫

※本キットをご使用になる前に必ずお読みください。

【開発の経緯】

アフラトキシンは、*Aspergillus flavus*などのカビが生産する発がん性物質で、動物や人に対して強い肝毒性などを有します。アフラトキシンは13種類に分類され、ピーナッツをはじめとするナッツ類、豆類、トウモロコシなどの穀類、および香辛料などで汚染が報告されているアフラトキシンB_1, B_2, G_1及びG_2と、主に乳において汚染が報告されているアフラトキシンM_1が食品衛生上問題となっています。これらのうち、アフラトキシンB_1, B_2, G_1及びG_2については、平成23年3月31日付け食安発0331第5号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「アフラトキシンを含有する食品の取扱いについて」で総アフラトキシン（アフラトキシンB_1, B_2, G_1及びG_2の総和）が10 μg/kgを超えて検出した場合に食品衛生法違反として取り扱うこととされています。

本品は、抗アフラトキシンモノクローナル抗体を用いたイムノアフィニティカラム（IAC）であり、食品中のアフラトキシン（B_1, B_2, G_1, G_2, 及びM_1）を分析する際に、精製および濃縮用前処理カラムとしてお使い頂けます。

【本品の特徴】

1）有機溶媒耐性が高いため（アセトニトリル濃度10%、メタノール濃度40%）、抽出溶液の希釈倍率を低く抑えることができます。
2）アフラトキシンB_1, B_2, G_1及びG_2に加え、アフラトキシンM_1も精製および濃縮可能です。
3）本製品により精製したサンプルは、関連商品「MycoJudgeトータルアフラトキシン」（ELISA法）による定量測定が可能です。

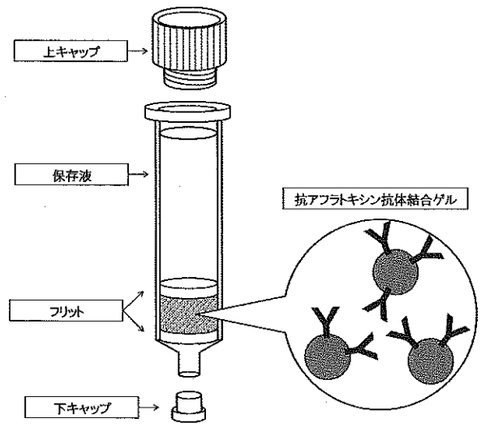
【キットの内容】

A:抗アフラトキシンモノクローナル抗体結合ゲル充填カラム……5本×4包装（合計20本）
B:取扱説明書……1部

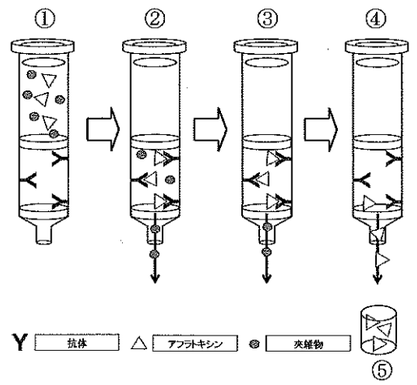
【目的】

食品抽出液からのアフラトキシン（B_1, B_2, G_1, G_2, 及びM_1）の精製および濃縮

【各部名称および原理】



①カラムに試料溶液を通液します。
②試料溶液中のアフラトキシンと、カラムに充填された抗アフラトキシン　抗体結合ゲルが結合し、アフラトキシンがカラム内に保持されます。試　料溶液中の夾雑物はそのまま排出されます。
③精製水を通液し、カラム内を洗浄してさらに夾雑物を除去します。
④有機溶媒を通液し、抗体を変性させてアフラトキシンを溶出します。
⑤精製および濃縮されたアフラトキシン溶液が得られます。



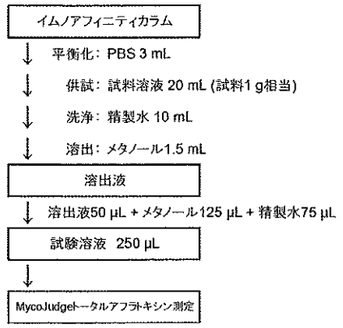
【必要な試薬・器具】

メタノール、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸、粉砕機、秤、密閉容器、50mL容量ポリプロピレン製遠沈管（キャップ付）、遠心分離機（2,000 x g以上、室温での遠心分離可能なものを推奨）、振とう機、ろ紙、ガラス繊維ろ紙、漏斗、メスシリンダー、ビーカー、ストップコック、マニホールド、リザーバー、アダプター、注射器、キャップ付バイアル（褐色かつシラン処理済みを推奨）、高速液体クロマトグラフ一式　等

注1）メタノールおよびアセトニトリルは高速液体クロマトグラフ用をご使用ください。

【参考（アフラトキシンB_1, B_2, G_1, G_2を「MycoJudgeトータルアフラトキシン」で試験する際の操作例）】

①抽出操作1に従い、試料溶液を得ます。
②精製操作に従い、溶出液を得ます。その際、カラムに注入する試料溶液は20 mL（試料1 g相当）とし、メタノール1.5 mLで溶出します。
③溶出液50μLにメタノール125μLと精製水75μLを加えてよく混合したものを試験溶液とします。
④MycoJudgeトータルアフラトキシンの取扱説明書に従い、測定を行ってください。
⑤測定結果を1.5倍した値が、試料中アフラトキシン濃度となります。（注1）
（例：MycoJudgeトータルアフラトキシン測定結果が5 ppbの場合、試料中アフラトキシン濃度は7.5ppbとなります）



注1）測定結果はアフラトキシンB_1, B_2, G_1, 及びG_2の総量を表します。

【使用上または取り扱い上の注意事項】

〔一般的な注意事項〕
①本キットをご使用になる際には、取扱説明書をよく読み、記載された操作方法に従って使用してください。
②使用期限の過ぎたキットは使用しないでください。使用期限はキット外装ラベルに記載されています。
③本キットとともに使用する機械・器具類の使用方法等については、それぞれの製造元もしくは販売元にご確認ください。
④本取扱説明書は検査担当者のガイドラインとして作成されています。各操作手順や各々の食品におけるアプリケーションの妥当性については自ら検証してください。
⑤本キットを使用し得られた結果の判断および利用はお客様の責任のもと実施してください。また、その結果生じた損害および損失について当社は責任を負うことはできません。
⑥商品の仕様については、予告なく変更になる場合があります。

〔危険防止上の注意事項〕
①本キットの内容液、ならびに試料溶液を始めとする操作時に生じた液体類、残渣等が、皮膚、粘膜、衣類等に付着しないよう注意してください。
②誤って本キットの内容液、ならびに試料溶液を始めとする操作時に生じた液体類、残渣等が、目や口に入った場合には、直ちに水道水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、医師の手当てを受けてください。

〔廃棄上の注意事項〕
①本キット、試料ならびに試料溶液の残りなどを廃棄する場合には、当該地域の条例に従って廃棄する、もしくは都道府県知事の許可を受けた産業廃棄物処理業者に委託してください。
②操作時に用いた器具、試料等は、破棄又は洗浄する前に、0.5～1.0%の次亜塩素酸ナトリウム溶液に2時間以上浸漬してアフラトキシンを無毒化させてください。

【保存方法・使用期限】

①保存方法：冷蔵（2～8℃）にて保存してください。また、凍結は避けてください。
②使用期限：製造日より12ヶ月。キット外装ラベルに記載されています。

【参考文献】

1. 平成23年3月31日付け食安発0331第5厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「アフラトキシンを含有する食品の取扱いについて」
2. 平成23年8月16日付け食安発0816第1号厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知「総アフラトキシンの試験法について」
3. 厚生労働省監修：食品衛生検査指針理化学編，（社）日本食品衛生協会，571-576（2005）

〔販売元および問い合わせ先〕
キット外箱ラベルに記載

〔製造元〕
〒300-2646 茨城県つくば市緑ヶ原3-3
日本ハム株式会社　中央研究所
電話：029(847)7825／FAX：029(848)1256
URL：http://www.rdc.nipponham.co.jp

【抽出操作1 （アフラトキシン B_1, B_2, G_1, G_2を試験する際の操作例）】

※ 抽出操作1は、平成23年8月16日付け食安発0816第1号通知「総アフラトキシンの試験法について」を元に記載しています。

①被検食品（検体）を粉砕機などにより均一な状態に粉砕したものを調製試料とします（注1）。
②調製試料50 gに、抽出液（精製水:メタノール＝1:4の混液）200 mLを加え、30分間振とうします（注2）。
③室温で静置して分離された上清をろ過し、得られたろ液を抽出溶液とします。
④抽出溶液10 mLを量り採り、精製水を加えて正確に50 mLとし、混合します（注3）（注4）。
⑤ガラス繊維ろ紙を用いてろ過し、ろ液を試料溶液とします（注5）。

被検食品
↓ 粉砕機などにより均一に粉砕
調製試料 50 g
↓ 水及びメタノール（1:4）混液200 mLを加える
↓ 5分間ホモジナイズ，または30分間振とう
↓ ろ過（ろ紙）
抽出溶液 10 mL
↓ 水を加えて正確に50 mLとする
↓ ろ過（ガラス繊維ろ紙）
試料溶液

注1）器具類を介したコンタミネーションを防止するため、よく洗浄した器具もしくはディスポーザブルの器具を使用してください。特に粉砕機やホモジナイザーについては検体ごとに確実に洗浄してください。

注2）試料によっては、アフラトキシンの回収率が低い場合があります。この場合、その他の抽出液として、アセトニトリル、精製水及びメタノール（6:4:1）混液等もお使い頂けます。

注3）試料によっては、精製水による希釈時に発生する沈殿物にアフラトキシンが吸着し、回収率が低下することがあります。この場合、ろ液をポリソルベート20を含む精製水又はPBSで希釈する方法が有効です。

注4）希釈倍率を変更する場合は、カラムに供試する試料溶液の有機溶媒濃度が、メタノールの場合は40%以下、アセトニトリルの場合は10%以下となるようにしてください。

注5）ろ過した試料溶液は、出来るだけ早くカラムに供試してください。時間が経過すると、ろ液がカラムに詰まる場合があります。

【抽出操作2 （アフラトキシン M_1を試験する際の操作例）】

※抽出操作2は、食品衛生検査指針 理化学編 2005のアフラトキシンM1の試験法を元に記載しています。

①約37℃に加温した液状乳をスターラーで均一に攪拌します。
②約40 mLを遠心管に移し、2,000 x g，室温で15分間遠心分離します。
③上層の脂肪層を除き、液体層をガラス繊維ろ紙を用いてろ過し、ろ液を試料溶液とします。（注1）

液状乳
↓ 約37℃に加温し、攪拌
液状乳 約40 mL
↓ 2,000 x g，室温で15min遠心分離
↓ 上層の脂肪層を除く
↓ 液体層をろ過（ガラス繊維ろ紙）
試料溶液

注1）ろ過した試料溶液は、出来るだけ早くカラムに供試してください。時間が経過すると、ろ液がカラムに詰まる場合があります。

【精製操作】

①カラムを室温に戻した後、上下のキャップをはずします。
②イムノアフィニティカラムの下部にストップコックを取り付け、これをバキュームマニホールド等に連結し、カラム内の保存液を排出します。
③PBS 3mLを通液し、カラムの平衡化を行います。
④リザーバーとカラムをアダプターを用いて連結します。
⑤試料溶液10mL（試料0.5g相当）をカラムに注入し、毎秒約1～2滴の流速で通液します（注1）。
※アフラトキシンM_1の場合には、試料溶液20mLをカラムに注入してください。
⑥次いで、精製水10 mLを注入し、カラムを洗浄します（注2）。
⑦精製水を排出後、注射器にアダプターを取り付けたものを用意し、これをカラム上部に連結して空気を押し出すことにより、カラム中ゲル内の水分を取り除きます。
⑧アセトニトリル1 mLをカラムに注入し、自然落下で溶出させた後5分間放置します。さらにアセトニトリル2 mLをカラムに注入し溶出します。
⑨⑦の手順と同様に注射器を用いて空気を押し出し、カラム中ゲル内のアセトニトリルを完全に溶出します。

イムノアフィニティカラム
↓ 平衡化：PBS 3 mL
↓ 供試：試料溶液 10 mL（試料0.5 g相当）
↓ 洗浄：精製水 10 mL
↓ 溶出：アセトニトリル3 mL
溶出液 3 mL

注1）希釈倍率を変更した場合には、試料量として0.5 g相当の試料抽出溶液をカラムに注入してください。

注2）試料によっては、試料溶液をイムノアフィニティカラムに注入後、精製水による洗浄でゲルの着色が取り除けず、定量結果に影響が認められた場合、0.01%（w/v）ポリソルベート20を含むPBS及び精製水それぞれ10 mL以上で順次洗浄した後、アセトニトリルで溶出する方法が有効です。

注3）溶出液を回収する容器として、シラン処理したガラス容器（使用前に20～30%アセトニトリル等で洗浄し、乾燥させたもの）を用いることを推奨します。

【HPLC 操作1 （アフラトキシン B_1, B_2, G_1, G_2の操作例）】

①溶出液を45℃以下で窒素気流を用いて濃縮し、溶媒を除去します。
②残留物にトリフルオロ酢酸 0.1 mLを加え、密栓して激しく撹拌します。
③暗所で15分間放置した後、アセトニトリル及び精製水（1:9）混液 0.9 mLを加えてよく混合したものを試験溶液とし、下記の測定条件を参考に測定を行ってください（注1）。

注1）必要に応じて、遠心処理等で不溶物を除去後、HPLC用試験溶液としてください。

溶出液 3 mL
↓ 窒素気流下で45℃以下に加温し蒸発乾固
残留物
↓ トリフルオロ酢酸0.1 mLを加え、撹拌する
↓ 暗所で15 min放置
↓ アセトニトリル及び水（1:9）混液 0.9 mLを加え、混合
試験溶液 1 mL
↓
HPLC測定

＜HPLC 測定条件＞

検出器	蛍光検出器（励起波長365nm，蛍光波長450nm）
カラム	オクタデシルシリル化シリカゲル 内径4.6mm，長さ150mmまたは250mm、粒径3～5μm
カラム温度	40℃
移動相	アセトニトリル，精製水およびメタノール（1:6:3）混液
流速	1.0mL/min
注入量	20μL

【HPLC 操作2 （アフラトキシン M_1 の操作例）】

①溶出液を45℃以下で窒素気流を用いて濃縮し、溶媒を除去します。
②残留物にアセトニトリル及び精製水（2:8）混液 1 mLを加えてよく混合したものを試験溶液とします（注1）。

注1）必要に応じて、遠心処理等で不溶物を除去後、HPLC用試験溶液としてください。

溶出液 3 mL
↓ 窒素気流下で45℃以下に加温し蒸発乾固
残留物
↓ アセトニトリル及び水（2:8）混液 1 mLを加え、混合
試験溶液 1 mL
↓
HPLC測定

＜HPLC 測定条件＞

検出器	蛍光検出器（励起波長365nm，蛍光波長435nm）
カラム	オクタデシルシリル化シリカゲル 内径4.6mm，長さ150mmまたは250mm、粒径3～5μm
カラム温度	40℃
移動相	アセトニトリルおよび精製水（25:75）混液
流速	1.0mL/min
注入量	100μL

【性能】

①アフラトキシンB_1, B_2, G_1, G_2（各2.5 ng）を含む16 %メタノール溶液10 mLを本カラムに供試したとき、各アフラトキシンの回収率が70～110%を示します。
②アフラトキシンM_1（10 ng）を含む精製水溶液20 mLを本カラムに供試したとき、回収率が70～110%を示します。

【妥当性評価データ】

①アフラトキシンB_1, B_2, G_1, G_2（各2.5 μg/kg）を添加したローストピーナッツを、本取扱説明書に従い、試験を行ったときの真度（回収率）及び精度は以下のとおりです。
真度、併行精度および室内精度いずれも、厚生労働省から通知されている「総アフラトキシンの試験法について」の真度および精度の目標値（真度:70～110%，併行精度:20%以下，室内精度:30%以下）を満たしています。

評価対象	試行回数	真度	併行精度	室内精度
アフラトキシン B_1	2併行×5日間	80.6%	2.5%	3.8%
アフラトキシン B_2		82.9%	2.0%	4.6%
アフラトキシン G_1		84.0%	2.2%	3.0%
アフラトキシン G_2		86.5%	2.4%	4.4%

②アフラトキシンM_1（0.5μg/kg）を添加した牛乳を、本取扱説明書に従い、試験を行ったときの真度（回収率）及び精度は以下のとおりです。

評価対象	試行回数	真度	併行精度	室内精度
アフラトキシン M_1	2併行×5日間	93.2%	1.3%	6.9%